

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 55-068293
(43)Date of publication of application : 22.05.1980

(51)Int.CI. C12P 1/02
// C12R 1/645

(21)Application number : 53-141720

(71)Applicant : SAKAKIDA MITSUHARU
IKEGAWA TETSUO

(22)Date of filing : 18.11.1978

(72)Inventor : SAKAKIDA MITSUHARU
IKEGAWA TETSUO

(54) PRODUCTION OF CARCINOSTATIC SUBSTANCE

(57)Abstract:

PURPOSE: The mycellia of Matsutake (mushroom) are cultured in a liquid medium and carcinostatic substances, Emitanin-5 are obtained from the mycellia and the filtrate of the culture medium.

CONSTITUTION: The mycellia of Tricholoma matsutake are cultured in a liquid medium and the medium is filtered into the mycellia and the extract is combined with a lower alcohol or acetone, then the precipitate is purified to give Emitanin-5-A. The supernatant is concentrated under reduced pressure and then freeze dried to give Emitanin-5-B. In the meantime, the filtrate of the medium is combined with a lower alcohol or acetone and the precipitate is purified to give Emitanin-5-C. And the supernatant is concentrated under reduced pressure and freeze dried to give Emitanin-5-D. The resulting Emitanin-5-A, B, C, and D are, when necessary, purified by treatment with ion-exchange resin, ultrafiltration, dialysis, chromatography, etc.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision
of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑫ 公開特許公報 (A)

昭55-68293

⑬ Int. Cl.³
C 12 P 1/02
// C 12 R 1/645

識別記号

府内整理番号
6760-4B

⑭ 公開 昭和55年(1980)5月22日

発明の数 1
審査請求 有

(全 4 頁)

⑮ 制癌物質の製造法

⑯ 特 願 昭53-141720

⑰ 出 願 昭53(1978)11月18日

⑱ 発明者 柳田光治

東京都中野区上鷺宮五丁目26番
11号

⑲ 発明者 池川哲郎

習志野市袖ヶ浦一丁目12番5号

⑳ 出願人 柳田光治

東京都中野区上鷺宮5丁目26番
11号

㉑ 出願人 池川哲郎

習志野市袖ヶ浦一丁目12番5号

明細書

1. 発明の名称 制癌物質の製造法

2. 特許請求の範囲

マツタケ (*Tricholoma matsutake*) の菌糸体を液体培養し、培養物を戻過後、菌糸体は熱水または希アルカリ浴液で抽出し、抽出液を低級アルコールまたはアセトンで沈殿精製し (エミタニン A)、およびまたはその上清液は減圧濃縮、凍結乾燥する (エミタニン B)。他方培養戻液は低級アルコールまたはアセトンで沈殿精製し (エミタニン C)、およびまたはその上清液は減圧濃縮、凍結乾燥する (エミタニン D)。上記エミタニン A、B、C、Dは必要に応じイオン交換樹脂処理、限外戻過、透析、クロマトグラフィーにより精製して制癌物質エミタニンを採取することを特徴とする制癌物質エミタニンの製造法

3. 発明の詳細な説明

この発明（以下本発明といいう）はマツタケ (*Tricholoma matsutake*) の菌糸体を液体培養し、培養物を戻過後、菌糸体は熱水または希ア

ルカリ浴液で抽出し、抽出液を低級アルコールまたはアセトンで沈殿精製し (エミタニン A)、およびまたはその上清液は減圧濃縮、凍結乾燥する (エミタニン B)。他方培養戻液は低級アルコールまたはアセトンで沈殿精製し (エミタニン C)、およびまたはその上清液は減圧濃縮、凍結乾燥する (エミタニン D)。上記エミタニン A、B、C、Dは必要に応じイオン交換樹脂処理、限外戻過、透析、クロマトグラフィーにより精製して制癌物質エミタニンを採取することを特徴とする制癌物質エミタニンの製造法に係るものである。

食用キノコの制癌物質に関する研究は、われわれの昭和43年の特許出願（特許第74450号）の発明に係るもののがその最初のものである。

本発明に用いる菌糸体としてはマツタケ (*Tricholoma matsutake*) IFO 6915～6935で日本微生物株保存機関連盟で保存されているか、または市販の子実体から分離できるものである。子実体からは次のようにして得る。まず新鮮なキノコ子実体を「原色日本菌類図鑑」（保育社発行、

今岡六也および本郷次雄者)により同定確認後、表面の汚れを滅菌水で洗い流し、ついで70%酒精綿で表面をぬぐつて殺菌し、これを小片にきざむかまたはホモジナイザーで破碎し、寒天培地上に無菌的にのせる。

マツタケの寒天培地としてはグルコース2%, 酵母エキス0.2~0.5%, 必要に応じ他の添加物(たとえばKH₂PO₄など)を加える。温度22°C~25°C、約3週間で菌糸が発達してくる。

斯くして保存株または子実体より得られた菌糸体を液体培養する。その培養基としては炭素源としてグルコースなどのヘキトース、シュクロースなどの炭水化物が利用し易い。窒素源としては酵母エキス、ペプトン、アミノ酸類またはアンモニウム塩等その他少量の無機、有機の化合物(たとえば第一リン酸カリ、硫酸マグネシウム、クエン酸鉄、ニコチン酸、葉酸等)の添加も有効である。培養基のpHは4.0~7.5の範囲、温度は20°C~27°Cが好ましく、静置または緩徐に振盪しながら培養する。培養期間は約5週間を要する。

-3-

ン硫酸反応、過沃紫ベンチジン反応、ナフトレゾルシン反応等が陽性で、過クロル鉄反応、マグネシウム酢酸反応は陰性である。赤外部吸収スペクトルの吸収特性も確認した。この物質は水に溶解し、ベンゼン、ヘキサン、アセトン等の有機溶媒には難溶であるが、熱メタノール、熱エタノール等に対してはわずかに溶解する。なおその理化学的性質についてはこの明細書の末尾に第1表として示した。

本発明に係る物質について制癌試験を行つた。内臓180をICRマウスの皮下に移植したのち24時間後から試料10mg/kg/dayで10日間腹腔に投与すると固型癌の増殖は、無処理のマウス群と較べてエミタニンAで78%, 同Bで69%, 同Cで80%, 同Dで70%阻止された。毒性はみられなかつた。

実施例

マツタケ(*Tricholoma matsutake*) IFO 6915~6935の保存株をグルコース2%, 酵母エキス0.5%, pH 4.5の寒天培地に移植し

本発明により得られる有効成分は菌糸体の成分としてもまた培養液中にも生産され、菌糸体成分からは熱水抽出により抽出(希アルカリ水溶液で抽出する場合は、これを酢酸で中和させる)したのち2~5倍量のアルコールまたはアセトンなどの水と任意に混合する有機溶媒を加えて沈殿精製し(エミタニンA)、その上澄液からはこれを減圧濃縮、凍結乾燥する(エミタニンB)。一方培養液は同様のアルコールまたはアセトンで沈殿精製し(エミタニンC)、その上澄液は減圧濃縮、凍結乾燥させる(エミタニンD)。

上記エミタニンA、B、C、Dは必要に応じ、これを精製することができる。エミタニンAおよびCの精製はイオン交換樹脂処理、ついでラボモジュールまたはダイアフロー膜を用いる陥れ戻し、透析、クロマトグラフィーにより、エミタニンBおよびDはイオン交換樹脂処理、陥れ戻し、クロマトグラフィーにより精製する。

本発明により得られる制癌物質エミタニンは、フェノール硫酸反応、モーリツシユ反応、アンスロ

-4-

て22°Cで3週間培養する。培養した菌糸体をかきとり、これをホモジナイジしてグルコース2%, 干燥酵母0.5%, pH 4.5の液体培地3Lに移植し、24°C、5週間板く壇盛しながら培養する。培養終了後これを遠心分離して菌糸体と培養液に分離する。菌糸体(310g)は1Lの热水により約5時間、2回にわたり抽出し、これを減圧濃縮して1Lとし、冷却後3倍量のエタノールを加え、生ずる沈殿を遠心分離する。これを100mLの水に溶かし0.5NのNH₄OAc 30mLを加え、生ずる沈殿を遠心分離する。これを透析後、凍結乾燥すると約125mgの灰白色のエミタニンAが得られる。エタノールを加え生ずる沈殿を遠心分離したその上澄液は減圧濃縮、凍結乾燥して灰黄色のエミタニンB約400mgが得られる。一方培養液の方は3倍量のエタノールを加えて生ずる沈殿をエミタニンA同様に処理して得られる灰白色の物質をさらにセファデックスG-200のカラムクロマトグラフィーにかけて水で溶出すると白黄色のエミタニンC約60mgが得られる。

-6-

培養液にエタノールを加え生ずる沈殿を遠心分離した後の上清液は油状液相、凍結乾燥して灰黄色のエミタニン D 約 300 mg が得られる。

第 1 表

別種名	区分	分子量	分子式	融点	元素分析値%
マツタケ	エミタニン A	10^4 以上	(C ₁₀ H ₁₆ O) _n	150°~260°Cで分解	C: 32.03 H: 7.51 O: 58.91
マツタケ	エミタニン B	10^5 以下	C,H,Nを含む	150°~260°Cで分解	C: 34.99 H: 5.71 N: 3.43
マツタケ	エミタニン C	10^4 以上	C,H,Nを含む	150°~260°Cで分解	C: 30.12 H: 5.47 N: 5.51
マツタケ	エミタニン D	5×10^4 以下	C,H,Nを含む	150°~260°Cで分解	C: 35.61 H: 6.13 N: 6.89

品色反応	比旋光度	赤外吸収スペクトル
フエノール硫酸反応+モーリッシュ反応+アンスロン硫酸反応+	+2.0°	3,300 cm ⁻¹ - 1付近に O-H の伸縮振動 2,900 cm ⁻¹ - 1付近に C-H の伸縮振動 1,000 ~ 1,100 cm ⁻¹ - 1付近に C-H, C-O の変角振動を有する。
フエノール硫酸反応+モーリッシュ反応+アンスロン硫酸反応+	+1.2°	3,300 cm ⁻¹ - 1付近に O-H の伸縮振動 2,900 cm ⁻¹ - 1付近に C-H の伸縮振動 1,000 ~ 1,100 cm ⁻¹ - 1付近に C-H, C-O の変角振動を有する。
フエノール硫酸反応+モーリッシュ反応+アンスロン硫酸反応+	+ .5°	3,300 cm ⁻¹ - 1付近に O-H の伸縮振動 2,900 cm ⁻¹ - 1付近に C-H の伸縮振動 1,000 ~ 1,100 cm ⁻¹ - 1付近に C-H, C-O の変角振動を有する。
フエノール硫酸反応+モーリッシュ反応+アンスロン硫酸反応+	+ .7°	3,300 cm ⁻¹ - 1付近に O-H の伸縮振動 2,900 cm ⁻¹ - 1付近に C-H の伸縮振動 1,000 ~ 1,100 cm ⁻¹ - 1付近に C-H, C-O の変角振動を有する。

-7-

手 続 補 正 書 (自発)

昭和 54 年 11 月 27 日

特許庁長官 川 原 能 雄 殿

1. 事件の表示 特願昭 53-141720 号

2. 発明の名称 制癌物質の製造法

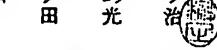
3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

住所 東京都中野区上鷺宮五丁目 26 番 11 号

郵便番号 165 電話東京(03)999-2122

氏名 稲 田 光 治

4. 補正の対象 「明細書の特許請求の範囲の欄」
「明細書の発明の詳細な説明の欄」

5. 補正の内容 別紙のとおり

補 正

1. 特許請求の範囲

(1) 明細書第 1 頁第 7 ~ 8 行「(エミタニン A)」を「(エミタニン-5-A)」に訂正する。以下同第 9 行「(エミタニン B)」を「(エミタニン-5-B)」に、同第 10 ~ 11 行「(エミタニン C)」を「(エミタニン-5-C)」に、同第 12 行「(エミタニン D)」を「(エミタニン-5-D)」に、同第 12 ~ 13 行「エミタニン A, B, C, D」を「エミタニン-5-A, B, C, D」に、同第 15 行「エミタニン」を「エミタニン-5」に、同第 16 行「エミタニン」を「エミタニン-5」にそれぞれ訂正する。

2. 補正後の特許請求の範囲

マツタケ (*Tricholoma matsutake*) の菌糸体を液体培養し、培養物を沪過後、菌糸体は熱水または希アルカリ溶液で抽出し、抽出液を低級アルコールまたはアセトンで沈殿精製し(エミタニン-5-A)、およびまたはその上澄液は減圧濃縮、凍結乾燥する(エミタニン-5-B)。他方培養

沪液は低級アルコールまたはアセトンで沈殿精製し(エミタニン-5-0), およびまたはその上清液は減圧濃縮、凍結乾燥する(エミタニン-5-D)。上記エミタニン-5-A, B, C, Dは必要に応じイオン交換樹脂処理、限外沪過、透析クロマトグラフィーにより精製して制癌物質エミタニン-5を採取することを特徴とする制癌物質エミタニン-5の製造法。

2 発明の詳細な説明の欄

(1) 明細書第5頁第7行「溶解する。」の次に「エミタニン-5の水溶液のpHをはかると、6~8を示す。」の23字を加入する。

(2) 明細書末尾の第1表下段右端に次の表示を加入する。

水溶液のpH値
6~8(中性)
6~8(中性)
6~8(中性)
6~8(中性)

(3) この欄に記載した次の「エミタニン」は「エミタニン-5」に訂正し、「エミタニンA(またはB, C, D)」は「エミタニン-5-A(または

特開昭55-68293(4)
B, C, D)に訂正する。明細書第2頁第2行
(エミタニンA)、同第4行(エミタニンB)、
同第5行(エミタニンC)、同第7行(エミタニンD)、
同第7~8行エミタニンA, B, C, D
同第10行エミタニン、同第11行エミタニン、
同第4頁第7行(エミタニンA)、同第8行(エミタニンB)、同第10行(エミタニンC)、同
第11行(エミタニンD)、同第12行エミタニンA, B, C, D、同第13行エミタニンA、同
第16行エミタニンB、同第19行エミタニン、
同第5頁第14行エミタニンA、同第6頁第15
行エミタニンB、同第17行エミタニンA、同第
20行エミタニンC、同第7頁第3行エミタニン。
末尾第1表区分欄上からエミタニンA、エミタニンB、エミタニンC、エミタニンD。

以上